

Tlamati Sabiduría



Expresión alterada de los RNAs largos no codificantes H19 y MALAT1 circulantes en pacientes con diabetes tipo 2

Rey David Camilo-Escamilla¹
Eugenia Flores-Alfaro¹
Vianet Argelia Tello-Flores¹
Mónica Ramírez²
Luz del Carmen Alarcón-Romero³
Olga Lilia Garibay-Cerdenares²
Fredy Omar Beltrán-Anaya¹
José Ángel Cahua-Pablo^{1*}

¹Laboratorio de Investigación en Epidemiología Clínica y Molecular, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero. Av. Lázaro Cárdenas, S/N Ciudad Universitaria, Col. La Haciendita, 39086, Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México.

²CONACyT - Universidad Autónoma de Guerrero, Av. Lázaro Cárdenas s/n, Ciudad Universitaria Sur, Col. La Haciendita, 39086, Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México.

³Laboratorio de Investigación en Citopatología e Histoquímica, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero. Av. Lázaro Cárdenas, S/N Ciudad Universitaria, Col. La Haciendita, 39086, Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México.

*Autor de correspondencia

jcahua@uagro.mx

Resumen

Evidencias recientes han identificado a los RNAs largos no codificantes (lncRNA) como factores epigenéticos importantes en la regulación de diversas enfermedades. Sin embargo, son pocos los estudios que han investigado sobre la expresión de los lncRNA en la diabetes tipo 2 (DT2). En este trabajo se analizó la relación entre la expresión de los lncRNA H19 y MALAT1 circulantes con DT2. Se realizó un estudio

Información del Artículo

Cómo citar el artículo:

Camilo-Escamilla R.D., Flores-Alfaro E., Tello-Flores V.A., Ramírez M., Alarcón-Romero L.C., Garibay-Cerdenares O.L., Beltrán-Anaya F.O., Cahua-Pablo J.A. (2023). Expresión alterada de los RNAs largos no codificantes H19 y MALAT1 circulantes en pacientes con diabetes tipo 2. *Tlamati Sabiduría*, 16, 12-21.

Editora Asociada: Dra. Mirna Azalea Romero



de casos y controles en población guerrerense, donde se incluyeron 25 pacientes con DT2 y 40 sujetos sanos como controles. Se midieron los niveles séricos de glucosa, colesterol, triglicéridos, colesterol de las lipoproteínas de alta (c-HDL) y baja densidad (c-LDL). Los niveles séricos de H19 y MALAT1 se determinaron por la técnica RT-qPCR utilizando sondas TaqMan. Los pacientes diabéticos presentaron elevación significativa de la presión arterial sistólica ($p = 0.01$); concentraciones séricas de glucosa ($p < 0.001$) y triglicéridos ($p = 0.02$). Se encontró un incremento promedio de 1.37 del logaritmo de las unidades relativas de H19 en los pacientes diabéticos, esto es un incremento aproximado del 63% en comparación con los controles ($p = 0.006$), mientras que MALAT1 no mostró cambios significativos en su expresión. Se concluye que estos lncRNAs podrían ser biomarcadores relacionados con la DT2.

Palabras clave: Diabetes tipo 2, lncRNA, H19, MALAT1.

Abstract

Recent evidence has identified long non-coding RNAs (lncRNAs) as important epigenetic factors in the regulation of various diseases. However, few studies have investigated lncRNA expression in type 2 diabetes (T2D). In this work, we analyzed the relationship between the expression of circulating H19 and MALAT1 lncRNAs with T2D. A case-control study was performed in a population from Guerrero, where 25 patients with type 2 diabetes and 40 healthy subjects were included as controls. Serum levels of glucose, cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein (HDL-C) and low-density (LDL-C) cholesterol were measured. Serum levels of H19 and MALAT1 were determined by RT-qPCR technique using TaqMan probes. Diabetic patients presented significant elevation of systolic blood pressure ($p = 0.01$); serum concentrations of glucose ($p < 0.001$) and triglycerides ($p = 0.02$). An average increase of 1.37 log relative units of H19 was found in diabetic patients, *this is an approximate increase of 63% compared to controls* ($p = 0.006$), while MALAT1 did not show significant changes in its expression. It is concluded that these lncRNAs could be biomarkers related to DT2.

Keywords: Type 2 Diabetes, lncRNA, H19, MALAT1.

Introducción

La diabetes es una enfermedad metabólica crónica, caracterizada por glucosa elevada en sangre, asociada con una deficiencia absoluta o relativa en la producción y/o en la acción de la insulina (WHO, 2021). En el año 2021, la Federación Internacional de Diabetes estimó que en el mundo había 537 millones de adultos de 20 a 79 años con diabetes. México tuvo 14.1 millones de casos (IDF, 2021). La diabetes tipo 2 (DT2) contribuye al desarrollo de enfermedad cardiovascular (ECV), accidente cerebrovascular, enfermedad renal, pérdida visual, neuropatía periférica y pie diabético (Zheng *et al.*, 2018). Recientemente, se han identificado a los RNAs no codificantes como factores epigenéticos en la

regulación de diversas enfermedades humanas. Entre estos RNAs se encuentran los RNAs largos no codificantes (lncRNAs). Estos son transcritos de más de 200 nucleótidos de longitud (Jarroux *et al.*, 2017); carecen de la capacidad codificante de proteínas, sin embargo, contribuyen en la regulación de la expresión génica en los niveles transcripcional, postranscripcional y traduccional, mediante numerosas funciones, incluyendo la modificación de la cromatina, impronta genética, regulación epigenética, control del ciclo celular, transcripción, traducción, splicing alternativo, entre otros procesos biológicos (Kopp y Mendell, 2018).

A nivel nuclear, los lncRNA actúan como activadores o inhibidores transcripcionales. En el

citoplasma, como competidores endógenos (ceRNA) de miRNAs, en la que el lncRNA se une al miRNA para evitar el silenciamiento del mRNA objetivo. Los lncRNAs se unen al DNA, RNA y proteínas (Yao *et al.*, 2019).

Estudios en modelos *in vitro* e *in vivo* han reportado la asociación de lncRNAs y enfermedades metabólicas, incluyendo síndrome metabólico, enfermedades hepáticas, obesidad, resistencia a la insulina y diabetes (Tello-Flores *et al.*, 2021). Se ha reportado que el lncRNA H19 (transcrito de impronta materna) contribuye a la homeostasis de glucosa, actuando como competidor endógeno de miR-let-7. H19 se une a miR-let-7 y evita que inhiba la expresión de sus genes blancos, incluidos mRNAs del receptor de insulina (INSR) y la lipoproteína lipasa (LPL) (Kallen *et al.*, 2013). La reducción de H19 aumenta la biodisponibilidad de miR-let-7. Por lo tanto, se reduce la captación de glucosa (Gao *et al.*, 2014), lo que sugiere que H19 ejerce un efecto protector sobre las alteraciones del metabolismo de la glucosa, excepto para la sobreexpresión de H19 asociada con resistencia a la insulina hepática a través de la activación del eje S-adenosilhomocisteína hidrolasa/factor nuclear 4 alfa de hepatocito (SAHH/HNF4 α) (Hernández-Aguilar *et al.*, 2021).

Por otro lado, se ha reportado que MALAT1 (transcripto de adenocarcinoma de pulmón asociado a metástasis) está relacionado con la etiología y la progresión de enfermedades metabólicas, como DT2 (Sathishkumar *et al.*, 2018), síndrome metabólico (Losko *et al.*, 2016), enfermedad cardiovascular (ECV) (Yan *et al.*, 2020) y diabetes gestacional (Zhang *et al.*, 2018a).

En condición de hiperglucemia, MALAT1 regula positivamente la transcripción de genes lipogénicos y proinflamatorios, lo que conduce a la activación de las cinasas de serina/treonina JNK y PKC. Estos aumentos están asociados con una regulación negativa en la vía de señalización de la insulina, lo que conduce al desarrollo de la resistencia a la insulina, estadio previo a la DT2 (Mitra *et al.*, 2008).

Si bien, se ha informado sobre el papel de los lncRNAs en las complicaciones relacionadas con la diabetes en modelos *in vitro*, *in vivo* y en biopsias de tejido humano. Se conoce poco sobre

el potencial de los lncRNAs circulantes como indicadores de DT2. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar los lncRNAs circulantes H19 y MALAT1 en el contexto clínico de la DT2, lncRNAs que podrían ser de utilidad en el diagnóstico y pronóstico de la DT2 y enfermedades asociadas, o bien, en el futuro, servir como blancos terapéuticos.

Materiales y métodos

Población de estudio

En este estudio se capturaron a pacientes con DT2 y a personas sin diabetes como controles, en el periodo comprendido de agosto 2019 a marzo de 2020. Los participantes fueron residentes de la ciudad de Chilpancingo y usuarios de los servicios médicos de los centros de salud y del Hospital General Dr. Raymundo Abarca Alarcón, de Chilpancingo, Gro. Se incluyeron 40 participantes sanos y 25 pacientes con DT2. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Autónoma de Guerrero, en apego a la Declaración de Helsinki. A cada participante se le aplicó una encuesta para obtener información sociodemográfica, económica y clínica.

Mediciones antropométricas y bioquímicas

Por impedancia bioeléctrica, utilizando el analizador BC554 (Tanita, USA), se realizaron las mediciones de peso (kg), porcentaje de agua y de grasa corporal. La estatura se determinó con el estadímetro M-222 (Seca, Hamburgo, Alemania). Para determinar la obesidad abdominal se midió la circunferencia de cintura (cm) utilizando la cinta antropométrica M-201 (Seca, Hamburgo, Alemania). Para determinar la presión arterial se utilizó el monitor automático 3AC1 PC (Microlife, Clearwater, FL, USA), antes de la medición se le solicitó a cada paciente reposar 5 min sentado y relajado, posteriormente colocó el brazo izquierdo en una superficie plana a la altura del corazón, procediendo a colocar el sujetador del monitor con el sensor cerca de la arteria braquial, esta medición se repitió por tres ocasiones de acuerdo con las indicaciones del fabricante, reportando el promedio de las tres mediciones.

De cada uno de los participantes se obtuvo muestra sanguínea por punción venosa, con un ayuno mínimo de 8 horas, como lo define la Asociación Americana para la Química Clínica (Benozzi, *et al.*, 2016). Las muestras se centrifugaron a 3,500 rpm por 7 min, para la separación del suero. Se determinaron las concentraciones séricas de glucosa, colesterol total, triglicéridos, colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) y colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL), utilizando métodos espectrofotométricos enzimáticos convencionales (Spinreact, Girona, España).

El diagnóstico de síndrome metabólico se realizó con base en los criterios de la Federación Internacional de Diabetes (FID), los cuales incluyen a la obesidad central (circunferencia de cintura ≥ 90 cm en el hombre y ≥ 80 cm para la mujer) y dos de los siguientes componentes: triglicéridos ≥ 150 mg/dL; colesterol HDL < 40 mg/dL en hombres y < 50 mg/dL en mujeres; presión arterial sistólica/diastólica $\geq 130/85$ mmHg, o en tratamiento farmacológico antihipertensivo; glucosa en ayunas ≥ 100 mg/dL), o diagnóstico previo de DT2.

Extracción de RNA

Se extrajo el RNA total de las muestras de suero utilizando el reactivo TRizol™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Brevemente, se colocaron 500 μ L de suero, 1.5 mL de reactivo trizol y se incubó por 5 min, luego se agregaron 40 μ L de cloroformo. Se mezcló e incubó durante 15 min y se centrifugó a 12 000 g durante 25 min a 4 ° C. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo estéril y se añadió 1 mL de isopropanol y se incubó durante 10 min. Luego se centrifugó a 12 000 g durante 15 min a 4 ° C, posteriormente se desechó el sobrenadante. El sedimento se mezcló con 1.5 mL de etanol para resuspender el RNA. Nuevamente fue centrifugado a 12 000 g, por 10 min a 4 ° C, posteriormente se dejó secar dentro de la campana de extracción a temperatura ambiente. El RNA fue resuspendido con 50 μ L de agua libre de nucleasas. La concentración y pureza del RNA se determinó a una longitud de onda de 260/280 nm con el equipo Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,

USA.). El RNA fue almacenado a -80 °C hasta su uso.

Obtención de cDNA

El RNA total fue sometido a retrotranscripción. Se tomaron 10 μ L para síntesis del cDNA usando el High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), siguiendo las indicaciones del fabricante, brevemente, se preparó la mezcla master mix 2X RT en hielo, adicionando para cada reacción 2 μ L de buffer 10X RT, 0.8 μ L de dNTP 25X, 2 μ L de primers RT 10X, 1 μ L de transcriptasa reversa (RT), 1 μ L de inhibidor de RNasa y 3.2 μ L de agua libre de nucleasas. Posteriormente se colocaron 10 μ L de master mix 2X RT en cada pozo de reacción, adicionando 10 μ L de RNA, se cubrió la placa y se centrifugó por unos segundos, manteniendo la placa en hielo hasta su procesamiento. El volumen de reacción se ajustó a 20 μ L.

Expresión de RNAs largos no codificantes

La expresión de los lncRNAs se cuantificó usando TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), H19 (cat # Hs00399294_g1) y MALAT1 (cat # Hs00273907_s1) por RT-qPCR usando el sistema de detección 7500 (Applied Biosystems, Foster Ciudad, CA, EE. UU.). Los datos de expresión génica se normalizaron a los niveles de expresión del gen endógeno GAPDH (cat # Hs02786624_g1) y obteniendo la expresión final por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Análisis estadístico

Las características sociodemográficas y clínicas de los participantes fueron resumidas en frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas, en media y desviación estándar para las variables cuantitativas simétricas, o en medianas y rango intercuartil (p25 – p75) para las no simétricas. Para la comparación de frecuencias se utilizó la prueba de X^2 , las medias se compararon con la prueba t de Student y las medianas con la prueba de Mann Whitney. Con el fin de evaluar la relación entre los lncRNAs estudiados con la DT2, se evaluaron modelos

lineales generalizados (enlace log) ajustados por edad, sexo e índice de masa corporal (IMC). El análisis de los datos se realizó utilizando el software estadístico STATA v.15, un valor de $p \leq 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. La figura se realizó en el software GraphPad Prism versión.

Resultados

Características clínicas de los participantes del estudio

En el estudio se incluyeron 25 pacientes con DT2 y 40 sujetos sanos como controles (Tabla 1). Del total de participantes, el 70.8% fueron mujeres y 29.2% hombres. La edad fue significativamente mayor en las personas con DT2 en comparación con el grupo control ($p < 0.001$). Las personas con DT2 presentaron elevación significativa de la presión arterial sistólica ($p = 0.01$), y de las concentraciones séricas de glucosa ($p < 0.001$) y triglicéridos ($p = 0.01$). El síndrome metabólico fue más frecuente en los pacientes con DT2 (64%), en comparación con los controles (35%) ($p = 0.02$).

Expresión sérica de los lncRNAs H19 y MALAT1

El promedio de la expresión relativa (UR: Unidades relativas) de H19 o MALAT1 no fue significativamente diferente entre los grupos de estudio (Fig. 1). Sin embargo, se observa un incremento en la expresión de H19 en los DT2 (1.84 UR) en comparación con los controles (0.84 UR). Por su parte, MALAT1 mostró un ligero incremento en su expresión en los individuos con DT2 (2.79 UR) comparado con los controles (2.12 UR) (Tabla 2). Por otra parte, al evaluar modelos lineales generalizados ajustados por edad, sexo e IMC, se identificó un incremento significativo en la expresión de H19 en los pacientes con DT2 (1.37 logUR), esto es, un incremento aproximado del 63% en comparación con los controles ($p = 0.006$). Adicionalmente, se observó que por cada año que incrementa la edad, la expresión de H19 disminuye en 0.07 logUR ($p = 0.044$), y el ser mujer la expresión de H19 disminuye en 1.5 logUR en comparación con los hombres ($p = 0.002$). No se observaron cambios significativos

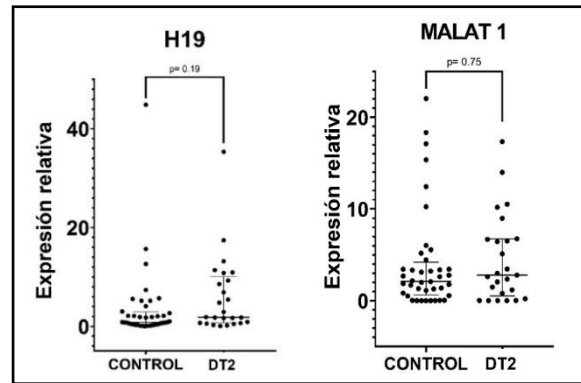


Figura 1. Niveles de expresión relativa de H19 y MALAT1 circulante en suero de pacientes con DT2 y controles. Se muestra la mediana con rango intercuartílico de la expresión relativa.

en la expresión de MALAT1 entre los grupos de estudio (Tabla 3).

Discusión y conclusiones

Diversos estudios han identificado la asociación o efecto de diferentes lncRNAs con el desarrollo o progresión de enfermedades metabólicas, como son la resistencia a la insulina (RI), obesidad, hígado graso no alcohólico, síndrome metabólico y diabetes, al actuar como reguladores maestros de diferentes procesos genéticos, epigenéticos y metabólicos, ya sea en condiciones fisiológicas normales o en procesos patológicos (Tello-Flores *et al.*, 2021). Nosotros analizamos la expresión de los lncRNAs H19 y MALAT1 en muestras séricas de pacientes con DT2 y controles. Se encontró un incremento significativo en la expresión de H19 en las personas con DT2 en comparación con los controles.

Es importante mencionar que las personas con DT2 tuvieron niveles elevados de glucosa sérica en comparación con los controles ($p < 0.001$), lo que sugiere que la mayoría de estos pacientes no tienen un control glucémico adecuado y, por tanto, cursan con alteraciones metabólicas, incluyendo estrés oxidativo, inflamación y dislipidemias (IDF, 2021). Nuestros resultados coinciden con un estudio previo de nuestro grupo de trabajo, y es similar a la mayoría de las investigaciones

Variables	Total n=65	Casos n=25	Controles n=40	p
Edad, años	46.2±9.8	52.2±8.5	42.5±8.6	<0.001 ^a
Sexo, n (%)				
Masculino	19 (29.2)	7 (28)	12 (30)	0.86 ^c
Femenino	46(70.8)	18 (72)	28 (70)	
IMC (kg/m ²)	28.8 (25.9-31.4)	27.8 (25.7-29.9)	30.2 (26-31.9)	0.15 ^b
Circunferencia cintura (cm)	96.2±11	95.6±8.0	96.6±12.6	0.70 ^a
% de grasa	33.2±9.2	30.7±9.3	34.7±8.9	0.10 ^a
% de agua	47.3±6.5	49.2± 6.4	46.3±6.4	0.08 ^a
PA sistólica (mmHg)	119 (109-137)	131 (119-140)	117 (109-127.5)	0.01 ^b
PA diastólica (mmHg)	75.1±9.9	75±9.7	77.1±10.1	0.98 ^b
Glucosa (mg/dL)	100 (83-124)	167 (108-258)	88 (79.5-103)	< 0.001 ^b
Colesterol (mg/dL)	170.9±35.1	174.2±41.6	168.9±30.7	0.56 ^b
Triglicéridos (mg/dL)	112 (83-142)	131 (105-186)	99.5 (78.5-130.5)	0.01 ^b
c-HDL (mg/dL)	46.6±16.4	46.6±13.5	46.5±18.1	0.97 ^a
c-LDL (mg/dL)	86.7±23.1	90.8±17.3	84.3±25.8	0.28 ^a
Ejercicio, n (%)				
No	34 (52.3)	8 (32)	26 (65)	0.01 ^c
Sí	31 (47.7)	17 (68)	14 (35)	
Síndrome Metabólico, n (%)				
No	35 (53.8)	9 (36)	26 (65)	0.02 ^c
Si	30 (46.2)	16 (64)	14 (35)	

Tabla 1. Características clínicas y bioquímicas de los grupos de estudio. Se muestran n (%), media ± desviación estándar, mediana (p25-p75). IMC: índice de masa corporal, PA: presión arterial, HDL: lipoproteína de alta densidad, LDL: lipoproteína de baja densidad, valor de p fue calculado por la prueba de t-student^a, Mann Whitney^b y prueba de X² ^c.

LncRNA	Total n=65	Casos n=25	Controles n=40	p
H19	1.75 (0.48-5.16)	1.84 (0.66-9.27)	0.84 (0.36-2.82)	0.06
MALAT1	2.61 (0.78-5.54)	2.79 (0.78-6.68)	2.12 (0.68-3.92)	0.50

Tabla 2. Cambios en la expresión relativa del lncRNAs en los grupos de estudio. Se muestra mediana y rango intercuartílico (p25-p75). El valor de p fue calculado con la prueba de Mann Whitney.

Variable	H19 (logUR)		MALAT1 (logUR)	
	β (IC 95%)	p	β (IC 95%)	p
DT2	1.37 (0.39, 2.35)	0.006	-0.34 (-1.2, 0.54)	0.444
Edad	-0.07 (-0.15, -0.002)	0.044	0.03 (-0.01, 0.07)	0.176
Sexo	-1.50 (-2.45, -0.54)	0.002	0.76 (-0.26, 1.79)	0.144
IMC	0.098 (-.0090, 0.20)	0.073	-0.008 (-0.06, 0.05)	0.790

Tabla 3. Relación entre los niveles de expresión de H19 y MALAT1 con DT2, edad, sexo e IMC. β: Coeficiente de regresión calculado por modelos lineales generalizados con enlace log, ajustado por edad, sexo e índice de masa corporal (IMC).

realizadas en pacientes con DT2 (Tello-Flores *et al.*, 2020). Además, la hipertrigliceridemia, acompañada de niveles elevados del c-LDL y bajos niveles de c-HDL, son alteraciones frecuentes de la diabetes (Mooradian, 2009). Nosotros identificamos alteraciones lipídicas en las personas con diabetes, principalmente los niveles séricos elevados de triglicéridos ($p = 0.01$).

Producto de la RI en DT2, se produce un incremento en la liberación de los ácidos grasos libres en los adipocitos, como resultado, inducen la síntesis hepática de triglicéridos y estimulan la producción de la apoproteína B (ApoB). De este modo, la RI promueve una sobreproducción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) ricas en triglicéridos, hecho que explica la hipertrigliceridemia en los pacientes diabéticos. Por otra parte, un incremento en el contenido de lípidos en el tejido adiposo promueve la síntesis de citocinas proinflamatorias, principalmente, interleucina 6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (Barazzoni *et al.*, 2018). El TNF α en sí mismo, altera la señalización de la insulina a través de la fosforilación del residuo de serina del sustrato del receptor de insulina (IRS1) y reduce la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4) en músculo esquelético y tejido adiposo, lo que disminuye la entrada de glucosa a las células, como resultado, se presenta hiperglucemia (Yaribeygi *et al.*, 2019).

Sin duda, la hiperglucemia e hipertrigliceridemia presentes en los sujetos con DT2 evaluados en nuestro estudio, son alteraciones frecuentes de la diabetes e indicadores de la desregulación de diversos procesos metabólicos y moleculares, incluyendo la desregulación de diversas moléculas, como podrían ser las proteínas y ácidos nucleicos, entre estos, los lncRNAs. Por otra parte, se ha evidenciado que los lncRNAs son detectables en el sistema circulatorio periférico humano, por lo cual, la detección de estos RNAs en plasma o suero podría utilizarse como una herramienta de pronóstico no invasiva para las patologías humanas, lo que los convierte en biomarcadores candidatos detectables mediante métodos como la qRT-PCR (Szilágyi *et al.*, 2020). En este estudio, analizamos la relación entre el nivel de expresión sérica de H19 y MALAT1 con DT2. Los modelos

lineales generalizados mostraron una sobreexpresión significativa de H19 en los diabéticos con respecto a los controles, mientras que MALAT1 mostró un ligero incremento en su expresión en los individuos con DT2 en comparación con las personas sin diabetes, sin embargo, este incremento no fue significativo.

Algunos estudios han informado que la sobreexpresión de H19 contribuye al desarrollo de RI, la cual es precursora de la DT2. Nilsson *et al.* (2015) reportan una asociación entre los niveles elevados de H19 con una disminución de la metilación en los sitios CpG y niveles reducidos de folato en tejido hepático de pacientes con DT2.

Un estudio hecho en un modelo animal reportó que la sobreexpresión de H19 en hígado de ratones diabéticos se asoció con un aumento en la producción de glucosa hepática y la intolerancia a la glucosa, mientras que el silenciamiento de este lncRNA mejoró la sensibilidad a la insulina. Así mismo, H19 induce la hipometilación del promotor del factor nuclear hepatocitario 4 alfa (HNF4A), aumentando su expresión y estimulando la expresión de los genes gluconeogénicos PEPCK1 y glucosa-6-fosfatasa catalítica (G6PC), lo que reduce la capacidad de la insulina para suprimir la producción de glucosa hepática. Este estudio concluye que la sobreexpresión de H19 contribuye al aumento en la producción de glucosa hepática y favorece la pérdida de la homeostasis de la glucosa (Zhang *et al.*, 2018).

En concordancia con los resultados de nuestro estudio, investigaciones previas reportan niveles circulantes significativamente elevados de H19 en cohortes de individuos diabéticos, lo que indicaría su potencial como posible biomarcador en la DT2 (Cheng *et al.*, 2019; Fawzy *et al.*, 2020; Tello-Flores *et al.*, 2020).

Por otra parte, el lncRNA MALAT1 se ha relacionado con diversas patologías, incluidas las complicaciones relacionadas con la diabetes, entre ellas, lesión por reperfusión isquémica, retinopatía, cataratas, aterosclerosis, miocardiopatía, esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad renal y diabetes gestacional (Abdulle *et al.*, 2019). También se ha demostrado que MALAT1 podría desempeñar un papel importante en la condición fisiopatológica, la inflamación de los tejidos y la

progresión de la diabetes mediante la modulación de la transcripción de genes (Lei *et al.*, 2018). Un mecanismo proinflamatorio debido a la hiperglucemia mediada por MALAT1 es la regulación positiva del antígeno amiloide sérico 3 (SAA3), que activa la transcripción de genes proinflamatorios como TNF- α e IL-6, lo que promueve la inflamación endotelial, que, a su vez, puede provocar enfermedad cardiovascular (Puthanveetil *et al.*, 2015).

En hepatocitos MALAT1 interactúa directamente con el factor de transcripción de unión a elementos reguladores de esteroides 1c (SREBP-1c), un regulador esencial de la lipogénesis. Esta unión inhibe la ubiquitinación de SREBP-1c, aumentando su actividad y la expresión de sus genes lipogénicos diana, lo que induce la acumulación de lípidos intracelulares y el desarrollo de resistencia a la insulina (Yan *et al.*, 2016).

Otro mecanismo mediante el cual MALAT1 contribuye a la fisiopatología de la DT2 es a través de la supresión de la señalización de la insulina al inhibir la fosforilación de IRS y AKT, mediante la activación de la cinasa N-terminal c-Jun (JNK), una cinasa sensible al estrés (Chen *et al.*, 2018). Este efecto regulador negativo ha sido corroborado por niveles significativamente mayores de expresión de MALAT1 en pacientes con diabetes mellitus gestacional (Zhang *et al.*, 2018a).

No obstante, en el grupo de trabajo, Tello-Flores y colaboradores identificaron baja expresión de MALAT1 asociado con el control glucémico, reportando que el 71.7% de los pacientes con DT2 mostraron un buen control glucémico, el cual fue evaluado mediante los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}), concluyendo que la reducción de los niveles de MALAT1 sugiere un menor riesgo de disfunción microvascular (Tello-Flores *et al.*, 2020).

En el presente estudio se hipotetiza que la variabilidad en las características clínicas de los pacientes, el tiempo de progresión de la DT2 y el tratamiento farmacológico, factores que difirieron nuestro estudio y el de Tello-Flores (2020), podrían contribuir en la variación en la expresión de estos dos lncRNAs. Por otra parte, es importante señalar que este estudio tuvo ciertas

limitaciones, como fue el hecho de que las alícuotas de suero fresco fueron almacenadas en ultracongelación (-80°C) por un periodo de 1 año. En segundo lugar, el diseño del estudio se limitó a cuantificar los niveles de expresión de los lncRNAs H19 y MALAT1 en suero, por lo que no se sabría con certeza si la baja expresión de estos lncRNAs se debe a su baja biodisponibilidad en suero, o bien, si están siendo inhibidos por otras biomoléculas. Por último, es importante reconocer que el tamaño de muestra pequeño, sin duda, contribuyó a la disminución del poder estadístico.

En conjunto, los hallazgos demostraron que hay sobreexpresión de H19 en los diabéticos en comparación con los controles, por su parte, y aunque no significativo, MALAT1 mostró tendencia al incremento en su expresión en los individuos con DT2, por lo que se sugiere que estos lncRNAs podrían servir como biomarcadores de la DT2.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la UAGro, a través de la Convocatoria de proyectos de investigación SEMILLA 2018.

Referencias

- Abdulle, L.E., Hao, J.L., Pant, O.P., Liu, X-F., Zhou, D-D., Gao, Y., Suwal, A., Lu, C-W. (2019). MALAT1 as a Diagnostic and Therapeutic Target in Diabetes-Related Complications: A Promising Long-Noncoding RNA. *International Journal of Medical Sciences*, 16, 548-555.
- Barazzoni, R., Cappellari, G.G., Ragni, M., Nisoli, E. (2018). Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations. *Eating and Weight Disorders*, 23, 149-157.
- Benozzi, S.F., Unger, G., Pennacchiotti, G.L. (2016). Calidad en la etapa preanalítica: importancia del ayuno. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 50, 643-648.
- Chen, J., Ke, S., Zhong, L., Wu, J., Tseng, A., Morpurgo, B., Golovko, A., Wang, G., Cai, J.J., Ma, X., Li, D., Tian, Y. (2018). Long Noncoding RNA MALAT1 Regulates Generation of Reactive Oxygen Species and the

- Insulin Responses in Male Mice. *Biochemical Pharmacology*, 152, 94-103.
- Cheng, X-W., Chen, Z-F., Wan, Y-F., Zhou, Q., Wang, H., Zhu, H-Q. (2019). Long non-coding RNA H19 suppression protects the endothelium against hyperglycemic-induced inflammation via inhibiting expression of miR-29b target gene vascular endothelial growth factor a through activation of the protein kinase B/endothelial nitric oxide synthase pathway. *Frontiers in Cell and developmental Biology*, 1, 263.
- Fawzy, M.S., Abdelghany, A.A., Toraih, E.A., Mohamed, A.M. (2020). Circulating long noncoding RNAs H19 and GAS5 are associated with type 2 diabetes but not with diabetic retinopathy: A preliminary study. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 20, 365-371.
- Gao, Y., Wu, F., Zhou, J., Yan, L., Jurczak, M.J., Lee, H-Y., Yang, L., Mueller, M., Zhou, X-B., Dadolo, L., Szendroedi, J., Roden, M., Flannery, C., Taylor, H., Carmichael, G.G., Shulman, G.I., Huang, Y. (2014). The H19/let-7 double-negative feedback loop contributes to glucose metabolism in muscle cells. *Nucleic Acids Research*, 42, 13799-13811.
- Hernández-Aguilar, A.I., Luciano-Villa, C.A., Tello-Flores, V.A., Beltrán-Anaya, F.O., Zubillaga-Guerrero, M.I., Flores-Alfaro, E. (2021). Dysregulation of lncRNA-H19 in cardiometabolic diseases and the molecular mechanism involved: a systematic review. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 21, 809-821.
- IDF (2021). *Diabetes Atlas*, 10th edn. Brussels, Belgium. International Diabetes Federation. <https://diabetesatlas.org/> (Acceso mayo, 2022).
- Jarroux, J., Morillon, A., Pinskaya, M. (2017). History, discovery and classification of lncRNAs. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1008, 1-46.
- Kallen, A-N., Zhou, X-B., Xu, J., Qiao, C., Ma, J., Yan, L., Lingeng, L., Liu, C., Yi, J-S., Zhang, H., Min, W., Bennett, A.M., Gregory, R.I., Ding, Y., Huang, Y. (2013). The imprinted H19 lncRNA antagonizes let-7 microRNAs. *Molecular Cell*, 52, 101-112.
- Kopp, F., Mendell, J.T. (2018). Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs. *Cell*, 172, 393-407.
- Lei, L., Chen, J., Huang, J., Lu, J., Pei, S., Ding, S., Kang, L., Xiao, R., Zeng, Q. (2018). Functions and regulatory mechanisms of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1. *Journal of Cellular Physiology*, 234, 134-151.
- Losko, M., Kotlinowski, J., Jura, J. (2016). Long noncoding rnas in metabolic syndrome related disorders. *Mediators Inflammation*, 2016, 5365209.
- Mittra, S., Bansal, V.S., Bhatnagar, P.K. (2008). From a glucocentric to a lipocentric approach towards metabolic syndrome. *Drug Discovery Today*, 13, 211-218.
- Mooradian, A.D. (2009). Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nature Clinical Practice, Endocrinology & Metabolism*, 5, 150-159.
- Nilsson, E., Matte, A., Perfilyev, A., de Mello, V.D, Käkälä, P., Pihlajamäki, J., Ling C. (2015). Epigenetic alterations in human liver from subjects with type 2 diabetes in parallel with reduced folate levels. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 100, E1491-E1501.
- Puthanveetil, P., Chen, S., Feng, B., Gautam, A., Chakrabarti, S. (2015). Long non-coding RNA MALAT1 regulates hyperglycaemia induced inflammatory process in the endothelial cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19, 1418-1425.
- Sathishkumar, C., Prabu, P., Mohan, V., Balasubramanyam, M. (2018). Linking a role of lncRNAs (long non-coding RNAs) with insulin resistance, accelerated senescence, and inflammation in patients with type 2 diabetes. *Human Genomics*, 12, 41.
- Szilágyi, M., Pös, O., Márton, É., Buglyó, G., Soltész, B., Keserű, J., Penyige A., Szemes, T., Nagy, B. (2020). Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 6827.
- Tello-Flores, V.A., Valladares-Salgado, A., Ramírez-Vargas, M.A., Cruz, M., del Moral-Hernández, O., Cahua-Pablo, J.Á., Ramírez, M., Hernández-Sotelo, D., Armenta-Solís, A., Flores-Alfaro, E. (2020). Altered levels of MALAT1 and H19 derived from serum or

- serum exosomes associated with type-2 diabetes. *Non-coding RNA Research*, 5, 71-76.
- Tello-Flores, V. A., Beltrán-Anaya, F.O., Ramírez-Vargas, M.A., Esteban-Casales, B.E., Navarro-Tito, N., Alarcón-Romero, L., Luciano-Villa, C.A., Ramírez, M., del Moral-Hernández, O., Flores-Alfaro, E. (2021). Role of Long Non-Coding RNAs and the Molecular Mechanisms Involved in Insulin Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 7256.
- WHO (2021). Diabetes. World Health Organization. https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1.
- Yan, C., Chen, J., Chen, N. (2016). Long noncoding RNA MALAT1 promotes hepatic steatosis and insulin resistance by increasing nuclear SREBP-1c protein stability. *Scientific Reports*, 6, 22640.
- Yan, Y., Song, D., Song, X., Song, C. (2020). The role of lncRNA MALAT1 in cardiovascular disease. *IUBMB Life*, 72, 334-342.
- Yao, R-W., Wang, Y., Chen, L-L. (2019). Cellular functions of long noncoding RNAs. *Nature Cell Biology*, 21, 542-551.
- Yaribeygi, H., Farrokhi, F., Butler, A., Sahebkar, A. (2019). Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *Journal of Cellular Physiology*, 234, 8152-8161.
- Zhang, Y., Wu, H., Wang, F., Ye, M., Zhu, H., Bu, S. (2018a). Long non-coding RNA MALAT1 expression in patients with gestational diabetes mellitus. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*, 140, 164-169.
- Zhang, N., Geng, T., Wang, Z., Zhang, R., Cao, T., Camporez, J.P., Cai, S.Y., (2018b). Elevated hepatic expression of H19 long noncoding RNA contributes to diabetic hyperglycemia. *JCI Insight*, 3, e120304.
- Zheng, Y., Ley, S.H., Hu, F.B. (2018). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews Endocrinology*, 14, 88-98.